云　南　植　物　研　究　2009，31 (4)：303～308
Acta Botanica Yunnanica　　DOI：10.3724 SP.J.1143.2009.09035

烟草雌、雄配子 DNA 含量变化

林美珍[1]，邓　桦[2]，魏冬梅[2]，田惠桥[2]
(1 漳州卫生职业学院药学系，福建 漳州　363000；2 厦门大学生命科学学院，福建 厦门　361005)

提要：采用显微分光光度法测定了烟草 (*Nicotiana tabacum*) 精细胞和卵细胞的 DNA 含量。烟草是二胞花粉，花粉萌发后生殖细胞在花粉管中分裂形成精细胞。授粉后 45 h 花粉管到达子房，在花粉管内的精细胞 DNA 含量为 1C。当花粉管在退化助细胞中破裂，释放出的两个精细胞开始合成 DNA。在与卵细胞融合前，两个精细胞 DNA 含量接近 2C。随着精细胞的到达及合成 DNA，卵细胞也开始合成 DNA，融合前的卵细胞 DNA 含量也接近 2C。精、卵细胞融合后，合子 DNA 含量为 4C。烟草雌、雄配子是在细胞周期的 G_2 期发生融合，属于 G_2 型。

关键词：烟草；精细胞；卵细胞；DNA 含量
中图分类号：Q 944　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2700 (2009) 04-303-06

Change of DNA Content in Male and Female Gametes of Tobacco (*Nicotiana tabacum*)

LIN Mei-Zhen[1], DENG Hua[2], WEI Dong-Mei[2], TIAN Hui-Qiao[2]**
(1 *Department of Pharmacy*, *Zhangzhou Medical Vocational College*, Zhangzhou 363000, China;
2 *School of Life Sciences*, *Xiamen University*, Xiamen 361005, China)

Abstract: The nuclear DNA content of male and female gametes of tobacco (*Nicotiana tabacum*) was measured using DAPI stain and microspectrofluorimetric measurement. Tobacco pollen is bicellular at anthesis, containing a vegetative cell and a generative cell, which divides to form two sperm cells in a pollen tube. The nuclear DNA content of generative cell in a pollen tube was at 2C level and that of two sperm cells in a pollen tube, which elongated in the style, at 1C level. Two sperm cells began to synthesize DNA after both were released in the degenerated synergid, and the quantity of nuclear DNA in both sperm cells approached 2C level before both fusing with egg and central cells. During this process, the nuclear DNA content of egg cell also began to increase and approached 2C level before fusing with sperm cell. After male and female gamete fused, the nuclear DNA content of zygote reached 4C level. Therefore, the fusion of male and female gametes of tobacco was at G_2 of cell cycle, and this fusion of fertilization belonged to G_2 type. This result displayed the fertilization multiformity in angiosperms.

Key words: Tobacco; Sperm cells; Egg cell; DNA content

前人研究结果表明：植物精细胞 DNA 含量是 1C 或 2C；大部分已检测的植物卵细胞 DNA 含量为 1C，处于单倍水平，但大麦成熟卵细胞中的 DNA 含量是 2～4C (田国伟等，2002)。Friedman (1991) 报道了裸子植物长叶麻黄 (*Ephedra trifurca*) 的精、卵细胞是在 1C 的 DNA 水平融合，但在显轴买麻藤 (*Gnetum gnemon*) 中，精、卵细胞是在 2C 的 DNA 水平融合 (Carmichael and Fried-

基金项目：国家自然科学基金 (30670126)
通讯作者：Author for correspondence; E-mail: hqtian@xmu.edu.cn; Tel: 0592-2186486
收稿日期：2009-02-24，2009-04-14 接受发表
作者简介：林美珍 (1965-) 女，副教授，主要从事药用植物学教学与研究。

man, 1995)。之后 Friedman (1999) 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中发现精细胞在花药的花粉粒中就开始进入细胞周期的 DNA 合成期 (S 期), 临近受精时, 胚囊中的精细胞 DNA 含量达到 2C。Friedman 的研究结果还证实了裸子植物中存在受精的 G_1 型和 G_2 型, 在被子植物中, 配子融合时的 G_2 类型则还需进一步证实。我们曾用显微荧光测定法对经 DAPI 染色的烟草 (*Nicotiana tabacum*) 雌、雄配子和合子核内的 DNA 含量进行了测定, 证实了烟草精、卵细胞在融合前分别合成 DNA 的现象 (Tian 等, 2005)。本文对烟草精、卵细胞和合子中的 DNA 含量进行系统的测量, 从细胞周期的角度探讨烟草受精过程。

1　材料与方法

供试烟草品种大青叶在 20～27℃, 光照 16 小时的生长室中种植。开花前花被去雄, 然后开花时再人工授粉以确定发育时间。烟草是二胞花粉, 人工萌发的花粉管中生殖细胞不分裂形成精细胞。烟草花柱近 4 cm 长, 花粉管需生长约 45 h 到达子房。卵细胞受精后两天开始分裂 (Tian and Russell, 1997)。为了检测精细胞成熟过程中的 DNA 含量变化, 将授粉后在体内生长了 8, 18, 26, 34 和 42 h、长度为 0.5, 1, 2, 3 和 4 cm 的花柱切下, 置于卡诺固定液中固定 24 h, 保存在 70% 乙醇中备用。授粉或不授粉花的胚珠在开花后 1、2 和 3.5 d 时用上述方法固定和保存。固定的花柱和胚珠用石蜡包埋方法切片, 切片厚度 7～8 μm。切片脱蜡后, 用 0.25 μg ml 4′, 6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) 染色 20 min, 封片后用 Zeiss 荧光光度显微镜观察和测量。以花粉管中精细胞的 100 荧光单位 (RFU) 定为单倍体 (1C), 以珠心细胞的 200 荧光单位定为二倍体 (2C) 作为测量的对照标准。测量每个时期花柱的样品数量超过 100 个, 测量胚囊的样品数量均超过 50。

2　结果

2.1　花粉管中的精细胞核 DNA 含量

烟草是二胞花粉, 开花时的花粉粒含有一个营养细胞和一个生殖细胞。花粉落到柱头 3 h 后开始萌发。花粉管在花柱中生长 5 h, 生殖细胞开始分裂形成两个精细胞。在花粉管中的生殖细胞的核细长, 呈现出很强的荧光 (图版 I: 1)。因生殖细胞核的长度超出了荧光显微镜的测量圈的范围, 它的相对 DNA 含量大约为 180 荧光单位 (RFU), 接近 2C 的含量。因此, 可以确定花粉管中的生殖细胞已基本通过细胞周期的 S 期, 是在 G_2 期。营养细胞核与生殖细胞核很接近, 也呈细长形, 但营养核的长度远远超过可测量的范围, 因此难以得出准确的营养核 DNA 含量的数据。

生殖细胞分裂后, 精细胞核依然呈长形, 但长度较生殖核小 (图版 I: 2), 完全处于荧光显微镜的测量圈范围内。在所取用的 4 个发育时期中, 精细胞的 DNA 荧光单位均在 93～97 RFU 之间 (图 1), 接近单倍体的 100 RFU, 相对 DNA 含量在 1C 水平。因此, 在花柱内生长的花粉管中的精细胞含有 1C 的 DNA 含量, 精细胞是处在细胞周期的 G_1 期。

花粉管中两个精细胞之间在不同的发育时期也显示出了 DNA 含量上的差异, 与营养核相联结的精细胞 (Svn) 比不与营养核相联结的精细胞 (Sua) 高 2～3 个荧光单位。

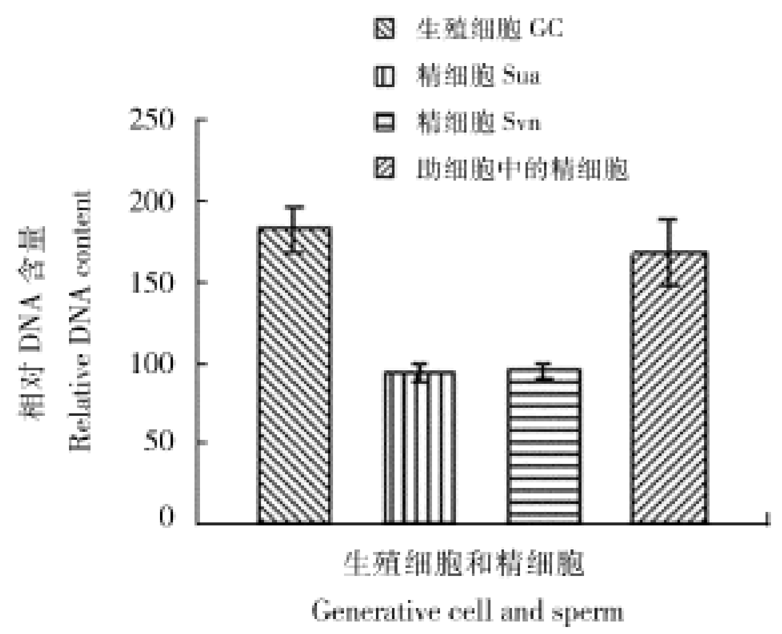


图 1　生殖细胞、花粉管中的两个精细胞和被释放到助细胞中的精细胞 DNA 相对含量比较。100≈1C DNA 相对含量

Fig. 1　Comparison of relative DNA content of generative cell and two sperm cells in pollen tube and sperm cells released in synergid. 100≈1C DNA content

2.2　被释放的精细胞核 DNA 含量

进入子房的花粉管穿过珠孔进入胚囊。烟草成熟胚囊中的细胞核都可被 DAPI 标记 (图版 I: 3)。在退化的助细胞中, 花粉管破裂释放内含物, 包括两个精细胞, 用 DAPI 标记的两个精细胞核的荧光非常清楚 (图版 I: 4)。刚释放的两个精细胞在退化助细胞的珠孔端, 然后移动到退

化助细胞的合点端，位于卵细胞核的附近（图版 I：5，6）。经常可以看到处于同一平面上的两个精细胞呈先后排列（图版 I：7），但仍难以断定那一个精细胞与卵细胞融合。

进入退化助细胞中的两个精细胞核 DNA 含量显现出增加的迹象。统计了在退化助细胞中的 51 个精细胞的 DNA 含量，大部分的核 DNA 含量处于 150 以上的相对荧光单位，提示这些精细胞核正在合成 DNA，处于细胞周期的 S 期。其中有 3 个精细胞核的 DNA 含量已达到 200 相对荧光单位，表明它们已通过了 S 期，进入 G_2 期。在 11 个胚囊的退化助细胞中两个精细胞位于切片的同一平面上（图版 I：7），为同时测量一对精细胞提供了条件，结果两个精细胞中的 DNA 相对荧光单位相差 18.0±12.9，但统计分析差异不显著。也许是数量太少，也许是两个精细胞 DNA 合成不同步。

2.3　卵细胞核的 DNA 含量

烟草成熟胚囊包括一个卵细胞，两个助细胞，一个具两个极核的中央细胞和三个反足细胞。用 DAPI 标记胚囊卵器细胞核的形态清晰，根据卵细胞和助细胞的相反极性和核的排列位置可区分出卵细胞核，助细胞核和中央细胞核（图版 I：3）。烟草子房中约有 3700 个胚珠，其花粉管生长 48 h，有些胚囊中已有花粉管了。与精细胞相比，卵细胞核的体积较大，荧光也比较分散（图版 I：4）。在花粉管长入胚囊之前，卵细胞核的相对荧光单位是 95.8±8.9（图版 I：5），反映出卵细胞含 1C 的 DNA 水平，处在细胞周期的 G_1 期。当花粉管进入胚囊，精细胞被释放到退化助细胞中并开始合成 DNA 后，卵细胞核也开始合成 DNA，所测量的 53 个卵细胞核的相对荧光单位平均是 158.1±34.7，提示卵细胞核开始合成 DNA，处于 S 期。从形态上看，正在合成 DNA 的卵细胞核的荧光强度也比合成以前明显强（图版 I：6）。此时，精细胞核的 DNA 含量是 192 相对荧光单位，而卵细胞核是 161。卵细胞合成 DNA 的过程要晚于精细胞。

为了证实卵细胞中 DNA 的合成是否受精细胞的影响，对去雄不授粉花的卵细胞也做了 DNA 的测量。在开花后 48 h，不授粉花的卵细胞核 DNA 含量仍处于 1C 水平，但在开花后 84 h（3.5 天），不授粉花的卵细胞 DNA 含量为 191±11 相对荧光单位，接近 2C 水平。这比授粉花中的卵细胞合成 DNA 推迟了约一天，暗示没有精细胞，卵细胞也启动合成 DNA，但精细胞的到来可刺激卵细胞提前合成 DNA。

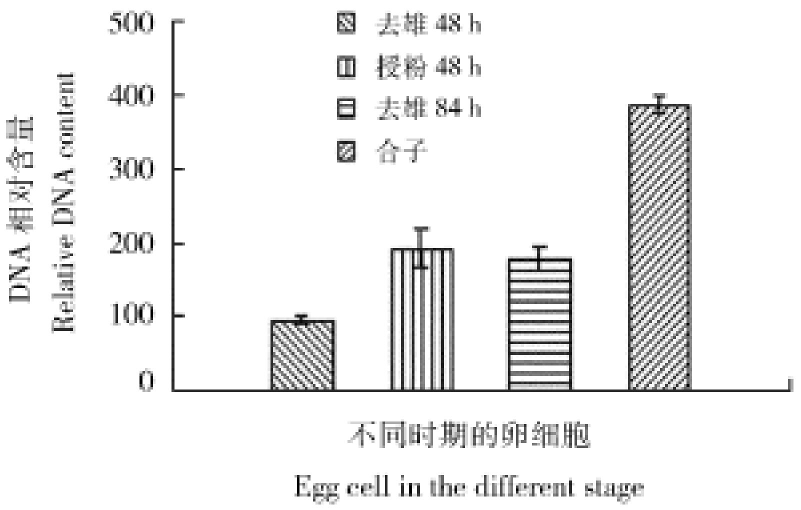


图 2　烟草不同时期卵细胞中的 DNA 相对含量比较
100≈1C DNA 相对含量

Fig. 2　Comparison of relative DNA content of egg cells in different development stages. 100≈1C DNA content

3　讨论

在动、植物的生长发育过程中，细胞周期调控起着关键的作用。在雌雄配子融合之前，其细胞周期需达到一致。在动物中，雌、雄配子都是含 1C 的 DNA 状态下发生融合。含 1C DNA 的配子显然是处在细胞周期的 G_1 期。当雌、雄配子融合后，DNA 含量加倍，二倍体的受精卵被激活，包括开始合成 DNA，通过细胞周期的 S 期。当受精卵 DNA 含量达到 4C 后启动分裂，开始胚胎发育。

早在上世纪 50 年代就有人用孚尔根反应（Feulgen reaction）结合显微分光光度法测量植物雌、雄配子 DNA 的含量。然而，早期的这方面研究也碰到了一些技术上的障碍：同一种材料的细胞在不同的生理状态下以及不同的操作条件下得出的结果有差异（Shink 等，1957；Iskida，1961）。D'Amato 等（1965）用孚尔根反应的方法测得大麦在花粉粒中的精细胞 DNA 含量是 2C，但 Hesemann（1973）的测量结果为 1～2C。Mericle and Mericle（1973）测得二棱大麦的精细胞 DNA 含量为 1C，卵细胞是 2～4C。尤其是有些植物的精细胞能染色，而卵细胞核在开花时难以染色，但这并不意味着卵细胞核中没有 DNA，

而是卵细胞的生理状态不同。这些技术上的困难以及有出入的研究结果使得早期有关生殖细胞中DNA含量的研究逐渐很少有人问津。

随着植物性细胞分离技术的发展以及新的DNA荧光染料的发现，有关配子及合子DNA含量的研究逐渐又有新的报道（Sherwood，1995；Mogensen and Holm，1995；Mogensen等，1999；Pònya等，1999）。这些作者用DNA特异荧光染料DAPI或H33258对植物精、卵细胞中的DNA含量做了分析，都证实精、卵细胞为单倍体，其DNA含量为1C。值得注意的是麻黄双受精的发现者Friedman将雌、雄配子的DNA含量变化与细胞周期的概念结合起来研究，提出了配子核融合时的不同模式：处于配子融合发生在G_1期的称为G_1型，而将通过S期的配子融合类型称为G_2型（Friedman，1991）。如在裸子植物显轴买麻藤中，精、卵细胞都含2C的DNA，处在细胞周期的G_2期，是配子融合的G_2类型（Carmichael and Friedman，1995）。后来他又检测了被子植物拟南芥精细胞核中DNA的含量，发现拟南芥生殖细胞有丝分裂后，刚形成的两个精细胞很快进入细胞周期的S期，在花药内的花粉粒中，两个精细胞就开始合成DNA，到传粉时精细胞中的DNA含量已达1.5C。传粉后在花粉管生长过程中精细胞继续合成DNA。当花粉管到达子房时，精细胞约含1.75C DNA。临近受精时，在胚囊中的精细胞平均含1.98C的DNA（Friedman，1999）。他的研究结果表明拟南芥也应该属于G_2类型。然而他未能测量拟南芥卵细胞的DNA含量，因为成熟的卵细胞没有荧光（私人交谈）。

烟草是二胞花粉，花粉管萌发后其生殖细胞DNA含量约为2C。授粉后8 h左右生殖细胞分裂形成两个精细胞。之后花粉管在花柱中生长的30多个小时中，精细胞DNA含量始终保持在1C水平。当花粉管进入胚囊，在退化助细胞中释放出两个精细胞后，两个精细胞的DNA含量开始增加并最终达到2C，说明烟草精细胞在退化助细胞中进入细胞周期的S期。随着精细胞到来并合成DNA，卵细胞的DNA含量也开始增加并在融合前达到2C水平。新形成的合子DNA含量为4C并一直保持到合子分裂为止。在只去雄不授粉的花中，卵细胞要推迟36 h后才开始合成DNA，进入S期。烟草精、卵细胞在到达G_2期才发生融合，属于G_2类型。在被子植物中也证实了雌、雄配子融合的G_2类型的存在，从细胞周期的角度揭示了被子植物受精过程的多样性。

细胞合成DNA意味着其细胞周期由G_1期进入S期，启动细胞周期变化的机制是深入研究的关键点。拟南芥精细胞在花粉粒中就开始了DNA的合成（Friedman，1999），它由G_1期进入S期的启动机制发生在花粉粒中。而在烟草中，精细胞在退化助细胞中被释放后才开始合成DNA，启动精细胞由G_1期进入S期的机制发生在退化助细胞中，这表明在两种植物中启动细胞周期的机制可能不同。另外，烟草未授粉花的卵细胞推迟合成DNA意味着卵细胞在没有精细胞存在的条件下也会启动细胞周期进入S期，但在有精细胞存在时可促进该过程提前启动，说明卵细胞合成DNA是其本身就具有的特性。裸子植物显轴买麻藤是四倍体植物，烟草也是四倍体植物，植物的多倍体特征是否与其配子融合的G_2类型有关？这需要在其它植物中进行广泛检验。

〔参 考 文 献〕

田国伟，申家恒，胡适宜，2002. 雄性和雌性配子及合子核中DNA的含量与细胞周期的状态［A］. 见：胡适宜，杨弘远主编. 被子植物受精生物学［M］. 北京：科学出版社，188—192

Carmichael JS，Friedman WE，1995. Double fertilization in Gnetum gnemon: the relationship between the cell cycle and sexual reproduction [J]. *Plant Cell*，7：1975—1988

D'Amato F，Devereux M，Scarascia M *et al.*，1965. The DNA comtent of the nuclei of the pollen grain in tobacco and barley [J]. *Caryologia*，18：377—382

Friedman WE，1991. Double fertilization in *Ephedra trifurca*，a nonflowering seed plant: the relationship between fertilization events and the cell cycle [J]. *Protoplasma*，165：106—120

Friedman WE，1999. Expression of the cell cycle in sperm of *Arabidopsis*: implications for understanding patterns of gametogenesis and fertilization in plants and other eukaryotes [J]. *Development*，126：1065—1075

Hesemann CU，1973. Untersuchungen zur Pollenentwicklung und Pollenschlauchbildung bei h heren Pflanzen [J]. *Theoretical and Applied Genetics*，43：232—241

Iskida MR，1961. A cytochemical study of nucleic acid in plant cells V.

Nucleic acid of Fulgen negative plants [J] . *Cytologia*, 26: 359—371

Mericle LW, Mericle RP, 1973 . Confounding the quandary of zygote DNA [J] . *Barley Genetic Newsletter*, 3: 39—42

Mogensen HL, Holm PB, 1995 . Dynamics of nuclear DNA quantities during zygote development in barley [J] . *Plant Cell*, 7: 487—494

Mogensen HL, Leduc N, Natthys-Rochon E *et al.*, 1999 . Nuclear DNA amounts in the egg and zygote of maize (*Zea mays* L) [J] . *Planta*, 197: 641—645

Sherwood RT, 1995 . Nuclear, DNA amount during sporogenesis and gametogenesis in sexual and aposporous buffelgrass [J] . *Sexual Plant Reproduction*, 8: 85—90

Shinke N, Ishida MR, Ueda K, 1957 . A study of the Feulgen reaction of plant cells [J] . *Process of Internatioanl Gene Symposium*, Supplement Vol . of Cytologia, 156—161

Tian HQ, Russell SD, 1997 . Calcium distribution in fertilized and unfertilized ovules and embryo sacs of *Nicotiana tabacum* L [J] . *Planta*, 202: 93—105

Tian HQ, Yuan T, Russell SD, 2005 . Relationship between double fertilization and the cell cycle in male and female gametes of tobacco [J] . *Sexual Plant Reproduction*, 17: 243—252

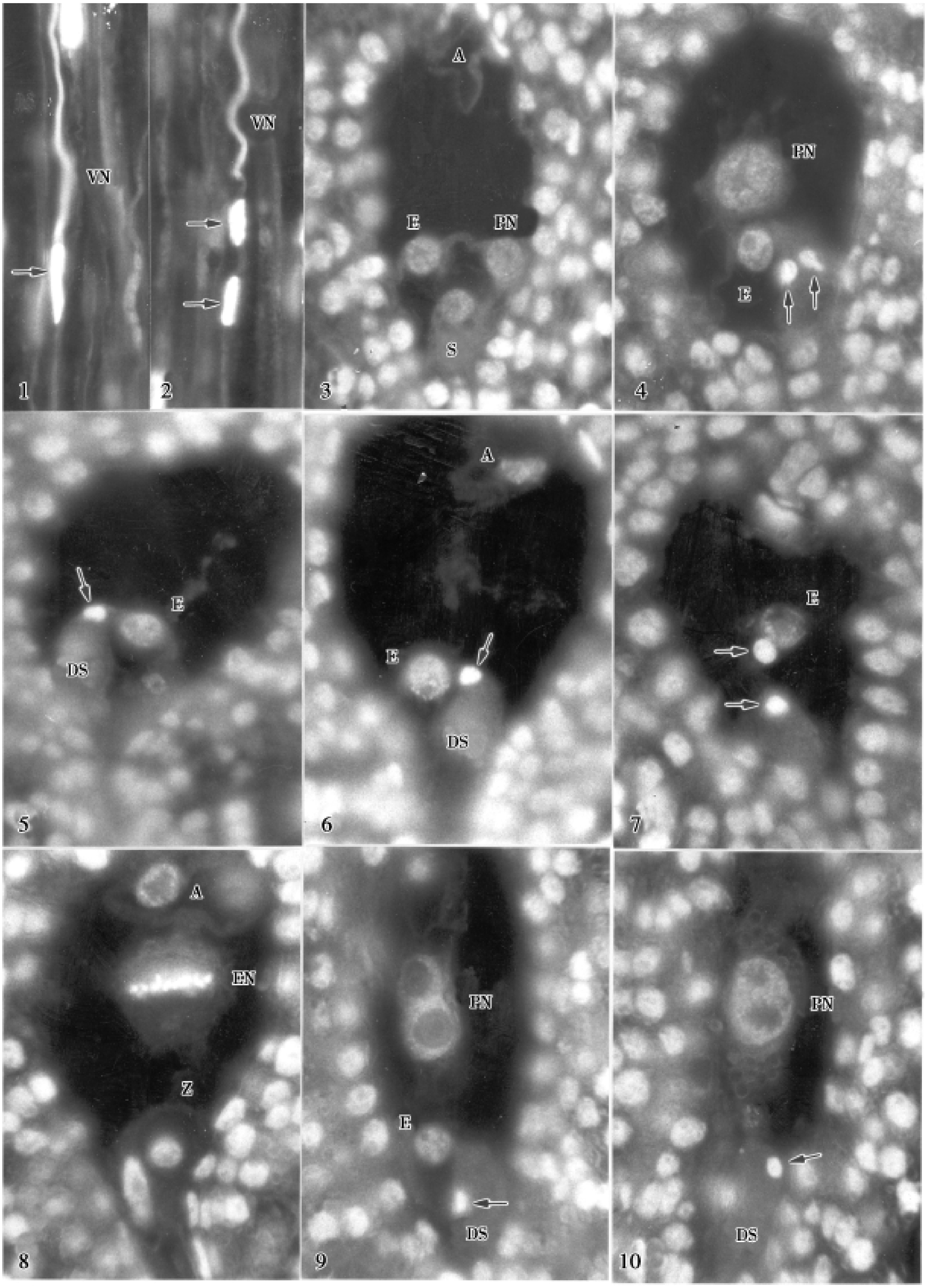
图版说明

A: **反足细胞核**; DS: **退化助细胞**; E: **卵细胞核**; EN: **胚乳核**; PN: **极核**; S: **助细胞核**; VN: **营养核**; Z: **合子**

图版Ⅰ: 1 . **在花柱中的花粉管内的生殖细胞（箭头）和营养核**; 2 . **在花柱中的花粉管内的两个精细胞核（箭头）和营养核**; 3 . **烟草成熟胚囊中的卵细胞核，助细胞核，极核和反足细胞核**; 4 . **花粉管进入退化助细胞后释放的两个精细胞核（箭头）**; 5 . **在退化助细胞中精细胞核（箭头）已移动到其合点端**; 6 . **在退化助细胞中精细胞核（箭头）已移动到其合点端，卵核的荧光亮度明显增加**; 7 . **受精胚囊中的两个精细胞核（箭头），领先的已移动到卵核附近**; 8 . **受精胚囊中，胚乳核已开始分裂**; 9 . **精细胞（箭头）刚被释放到退化助细胞时，两个极核还未融合**; 10 . **当精细胞（箭头）移动到退化助细胞的合点端时，两个极核融合成次生核（所有图片放大** 900 **倍）**.

Explanation of Plate

A: antipodal nucleus; DS: degenerated synergid; E: egg nucleus; EN: endosperm nucleus; PN: polar nucleus; S: synergid nucleus; VN: vegetative nucleus; Z: zygote

Plate Ⅰ: 1 . Generative cell (arrow) and vegetative nucleus in a pollen tube in the style; 2 . Two sperm nuclei in a pollen tube in the style after generative cell divided; 3 . A mature tobacco embryo sac with egg nucleus, synergid nucleus, a polar nucleus and a antipodal nucleus; 4 . Two sperm nuclei (arrows) were released in degenerated synergid after pollen tube broken; 5 . A sperm nucleus (arrow) in degenerated synergid; 6 . A sperm nucleus (arrow) in degenerated synergid . The fluorescence of egg nucleus increased evidently; 7 . Between two sperm nuclei (arrows), one moved faster than another one and arrived at egg cell; 8 . In a fertilized embryo sac, endosperm nucleus was dividing; 9 . When sperm cell (arrow) was just released in degenerated synergid, two polar nuclei still were intact and no fusion; 10 When sperm (arrow) moved to chalazal end of degenerated synergid, two polar nuclei began to fuse each other . (All of the figures enlarge 900 times)

林美珍等: 图版 I LIN Mei-Zhen *et al*.: Plate I